

PCT/JP00/01353

06.03.00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

E. U. V.

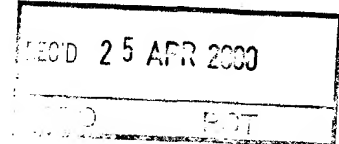
JP00 01353

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年 3月26日



出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第083964号

出 願 人
Applicant(s):

三菱レイヨン株式会社

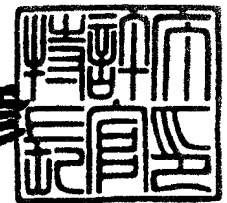
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 4月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3023308

【書類名】 特許願

【整理番号】 P99-0169

【提出日】 平成11年 3月26日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/11

【発明の名称】 核酸固定化ゲル保持多孔質繊維並びに該多孔質繊維配列
体及びその薄片

【請求項の数】 6

【発明者】

【住所又は居所】 広島県大竹市御幸町20番1号 三菱レイヨン株式会社
中央技術研究所内

【氏名】 伊藤 千穂

【発明者】

【住所又は居所】 広島県大竹市御幸町20番1号 三菱レイヨン株式会社
中央技術研究所内

【氏名】 秋田 隆

【発明者】

【住所又は居所】 広島県大竹市御幸町20番1号 三菱レイヨン株式会社
中央技術研究所内

【氏名】 村瀬 圭

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三菱レイヨン
株式会社 化学品開発研究所内

【氏名】 湯 不二夫

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三菱レイヨン
株式会社 化学品開発研究所内

【氏名】 渡辺 文昭

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三菱レイヨン
株式会社 化学品開発研究所内

【氏名】 藤井 渉

【特許出願人】

【識別番号】 000006035

【氏名又は名称】 三菱レイヨン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸固定化ゲル保持多孔質繊維並びに該多孔質繊維配列体及びその薄片

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 多孔質繊維の空隙部分に核酸固定化ゲルが保持された核酸固定化ゲル保持多孔質繊維。

【請求項 2】 請求項 1 記載の核酸固定化ゲル保持多孔質繊維の束を含む核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体。

【請求項 3】 繊維配列体中の繊維が規則的に配列されたものである請求項 2 記載の核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体。

【請求項 4】 繊維の束が、 1 cm^2 あたり 100 本以上の繊維を含むものである請求項 2 又は 3 記載の核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体。

【請求項 5】 核酸の種類が、各繊維の全部又は一部において異なるものである請求項 2～4 のいずれか 1 項に記載の核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体。

【請求項 6】 請求項 2～5 のいずれか 1 項に記載の核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体の繊維軸と交差する切断面を有する、前記核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体の薄片。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、核酸が固定化された高分子材料に関する。詳しくは、多孔質繊維の空隙部分に核酸固定化ゲルが保持された核酸固定化ゲル保持多孔質繊維並びに核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体及びその薄片に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、各種生物におけるゲノムプロジェクトが進められており、ヒト遺伝子をはじめとして、多数の遺伝子とその塩基配列が急速に明らかにされつつある。配列の明らかにされた遺伝子の機能については、各種の方法で調べることができる

が、その有力な方法の一つとして、明らかにされた塩基配列情報を利用した遺伝子発現解析が知られている。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションに代表されるような、各種の核酸：核酸間ハイブリダイゼーション反応や各種のPCR反応を利用した方法が開発され、当該方法により各種遺伝子とその生体機能発現との関係を調べることができる。しかしながら、これらの方法では適用し得る遺伝子の数に制限がある。したがって、今日のゲノムプロジェクトを通して明らかにされつつあるような、一遺伝子レベルという極めて多数の遺伝子から構成される複雑な反応系全体からみると、上記方法により遺伝子の総合的・系統的解析を行うことは困難である。

最近になって、多数遺伝子の一括発現解析を可能とするDNAマイクロアレイ法（DNAチップ法）と呼ばれる新しい分析法、ないし方法論が開発され、注目を集めている。

【0003】

これらの方法は、いずれも核酸：核酸間ハイブリダイゼーション反応に基づく核酸検出・定量法である点で原理的には従来の方法と同じであるが、マイクロアレイ又はチップと呼ばれる平面基盤片上に、多数のDNA断片が高密度に整列固定化されたものが用いられている点に大きな特徴がある。マイクロアレイ法の具体的使用法としては、例えば、研究対象細胞の発現遺伝子等を蛍光色素等で標識したサンプルを平面基盤片上でハイブリダイゼーションさせ、互いに相補的な核酸（DNAあるいはRNA）同士を結合させ、その箇所を蛍光色素等でラベル後、高解像度解析装置で高速に読みとる方法が挙げられる。こうして、サンプル中のそれぞれの遺伝子量を迅速に推定できる。即ち、この新しい方法の本質は、基本的には反応試料の微量化と、その反応試料を再現性よく多量・迅速・系統的に分析、定量しうる形に配列・整列する技術との統合であると理解される。

核酸を基盤上に固定化するための技術としては、上記ノーザン法同様、ナイロシート等の上に高密度に固定化する方法の他、更に密度を高めるため、ガラス等の基盤の上にポリリジン等をコーティングして固定化する方法、あるいはシリコン等の基盤の上に短鎖の核酸を直接固相合成していく方法などが開発されている。

【0004】

しかし、例えば、ガラス等の固体表面を化学的又は物理的に修飾した基盤上に核酸をスポッティング固定化する方法[Science 270, 467-470(1995)]は、スポット密度でシート法より優れるものの、スポット密度及びスポット当たり固定できる核酸量がシリコン基盤上における直接合成法(U.S. Patent 5,445,934、U.S. Patent 5,774,305)と比較して少量であり、再現が困難である点が指摘されている。他方、シリコン等の基盤の上にフォトリソグラフィ技術を用い、多種の短鎖核酸をその場で規則正しく固相合成していく方法に関しては、単位面積あたりに合成しうる核酸種数(スポット密度)及びスポット当たりの固定化量(合成量)、並びに再現性等において、スポッティング法より優れるとされるものの、固定化しうる化合物種は、フォトリソグラフィにより制御可能な比較的短鎖の核酸に限られる。さらに、高価な製造装置と多段の製造プロセスにより、チップ当たりの大きなコストダウンが困難とされる。その他、微小な担体上に核酸を固相合成しライブラリー化する手法として、微小なビーズを利用する方法が知られている。この方法は、チップ法より長鎖の核酸を多種・安価に合成することが可能であり、またcDNA等より長鎖の核酸も固定可能と考えられる。しかしながら、チップ法と異なり、指定の化合物を指定の配列基準で再現性よく整列させたものを作製することは困難である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

このような状況下、鎖長によらず核酸を所定の濃度に固定化でき、測定可能な形に高密度に再現よく配列化可能で、安価な大量製造に適応しうる新たな体系的な方法論の確立は、今後重要性を増すと考えられる遺伝子解析に強く求められるものであり、本発明が解決しようとする課題である。

具体的には、本発明が解決しようとする課題は、ナイロンシートやガラス基盤のような二次元担体上への微量スポッティングや微量分注による核酸配列体製造法に比べ、核酸固定化量が高く、単位面積あたり配列される核酸分子種の高密度化が可能で、大量生産により適した配列体、すなわち核酸が固定化された二次元的(平面的)配列体(固定化核酸二次元配列体という)の製造法の確立である。

また、本発明が解決しようとする課題はシリコン基盤上へのフォトリソグラフィーと固相合成との組み合わせによる高密度オリゴ核酸配列体製造法と比べ、cDNAを含む長鎖の核酸にも適応可能で、製造コストのより低い固定化核酸二次元配列体製造法の確立である。

そこで、本発明は、核酸固定化ゲル保持多孔質繊維並びに核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体及びその薄片を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、上述の如き課題を解決すべく、鋭意検討を重ねた結果、核酸整列化プロセスと固定化プロセスとを同一の二次元担体上で行う従来法の発想を改め、核酸の固定化プロセスを一次元構造体としての繊維上（1本の繊維上）に独立して行い、それらの整列化プロセスに各種の繊維賦形技術を導入することにより三次元構造体としての繊維束を作製し、得られる繊維束の切片化プロセスを経ることで、固定化核酸二次元高密度配列体を作製し得ることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0007】

すなわち、本発明は、多孔質繊維の空隙部分に核酸固定化ゲルが保持された核酸固定化ゲル保持多孔質繊維である。

さらに、本発明は、前記核酸固定化ゲル保持多孔質繊維の束を含む核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体である。該配列体としては、例えば列体中の繊維が規則的に配列されたものが挙げられ、 1 cm^2 あたり100本以上の繊維を含むものが挙げられる。また、核酸固定化ゲルに含まれる核酸の種類としては、各繊維の全部又は一部において異なるものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体の繊維軸と交差する切断面を有する、前記核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体の薄片である。

【0008】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、核酸が固定化されたゲルを保持する繊維であって、該繊維が多孔質

のもの（以下、「核酸固定化ゲル保持多孔質繊維」ともいう。）である。多孔質とは、繊維に無数に存在する空隙（隙間）を意味する。

本発明において、ゲルに固定化する対象となる核酸としては、デオキシリボ核酸（DNA）やリボ核酸（RNA）が挙げられる。本発明に用いる核酸は、市販のものでもよく、また、生細胞などから得られた核酸でもよい。

【0009】

生細胞からのDNA又はRNAの調製は、公知の方法、例えばDNAの抽出については、Blinらの方法（Blin et al., Nucleic Acids Res. 3: 2303 (1976)）等により、また、RNAの抽出については、Favaloroらの方法（Favaloro et al., Methods Enzymol. 65: 718 (1980)）等により行うことができる。固定化する核酸としては、更に、鎖状若しくは環状のプラスミドDNAや染色体DNA、これらを制限酵素により若しくは化学的に切断したDNA断片、試験管内で酵素等により合成されたDNA、又は化学合成したオリゴヌクレオチド等を用いることもできる。

【0010】

本発明に用いることができるゲルの種類は特に制限されないが、例えばアクリルアミド、N、N-ジメチルアクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-アクリロイルアミノエトキシエタノール、N-アクリロイルアミノプロパノール、N-メチロールアクリルアミド、N-ビニルピロリドン、ヒドロキシエチルメタクリレート、（メタ）アクリル酸、アリルデキストリン等の単量体の一種類または二種類以上と、メチレンビス（メタ）アクリルアミド、ポリエチレングリコールジ（メタ）アクリレート等の多官能性単量体とを共重合したゲルを用いることができる。その他本発明において使用できるゲルとして、例えばアガロース、アルギン酸、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール等のゲル、またはこれらを架橋したゲルを挙げることができる。

【0011】

本発明では、核酸をそのままゲルに固定化してもよく、また、核酸に化学的修飾を施した誘導体や、必要に応じて変成させた核酸を固定化してもよい。核酸のゲルへの固定化には、ゲルに物理的に包括する方法や、ゲル構成成分への直接的

な結合を利用してもよく、核酸を一旦高分子体や無機粒子などの担体に共有結合あるいは非共有結合により結合させ、その担体をゲルに固定化してもよい。

例えば、核酸の末端基にビニル基を導入し(WO98/39351)、アクリルアミド等のゲルの構成成分と共重合させることができる。共重合においては、単量体、多官能性単量体及び重合開始剤と共に共重合する方法、単量体及び重合開始剤と共に共重合したのち、架橋剤でゲル化する方法などがある。

【0012】

また、アガロースを臭化シアン法でイミドカルボネート化しておき、末端アミノ化した核酸のアミノ基と結合させてからゲル化することもできる。この際、核酸固定化したアガロースと他のゲル(例えばアクリルアミドゲル等)との混合ゲルにしてもよい。

その他の方法としては、高分子粒子や無機粒子等の担体に核酸を結合し、該粒子を上述のゲルに包括固定化する方法が挙げられる。例えば、ビオチン化した核酸とアビジン化したアガロースビーズ(シグマ社製 アビジン化アガロース等)を反応させることによって、核酸が固定化されたアガロースビーズを得ることができる。核酸固定化アガロースビーズはアクリルアミドゲル等に包括固定化することができる。

【0013】

また、ゲルや担体への結合においては、グルタルアルデヒドや1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)等の架橋剤を用いて結合させることもできる。核酸の一般的な化学的修飾としては、アミノ化、ビオチン化、ディゴキシゲニン化等が知られているが[Current Protocols In Molecular Biology, Ed.; Frederick M. Ausubel et al.(1990)、脱アイソトープ実験プロトコル(1)DIGハイブリダイゼーション(秀潤社)]、本発明ではこれらのいずれの修飾法も採用することができる。一例として、核酸へのアミノ基導入に関して説明する。

【0014】

アミノ基を有する脂肪族炭化水素鎖と一本鎖核酸との結合位置は特に限定されるものではなく、核酸の5'末端または3'末端のみならず核酸の鎖中(例えば

、リン酸ジエステル結合部位または塩基部位)であってもよい。この一本鎖核酸誘導体は、特公平3-74239号公報、米国特許4,667,025号、米国特許4,789,737号等に記載の方法にしたがって調製することができる。この方法以外にも、例えば、市販のアミノ基導入用試薬[例えば、アミノリンクII(商標名); PE バイオシステムズジャパン社、Amino Modifiers(商標名); クロンテック社]などを用いて、又はDNAの5'末端のリン酸にアミノ基を有する脂肪族炭化水素鎖を導入する周知の方法(Nucleic Acids Res., 11(18), 6513-(1983))にしたがって調製することができる。

【0015】

本発明において、核酸固定化ゲル保持多孔質繊維として用いることができる多孔質繊維状材料としては、多孔質繊維の空隙部分に核酸固定化ゲルを保持できるものであれば特に限定されるものではないが、合成繊維、半合成繊維、再生繊維、無機繊維のごとき化学繊維、及び天然繊維等が挙げられる。

合成繊維の代表例としては、ナイロン6、ナイロン66、芳香族ポリアミド等のポリアミド系の各種繊維、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレート、ポリ乳酸、ポリグリコール酸等のポリエステル系の各種繊維、ポリアクリロニトリル等のアクリル系の各種繊維、ポリエチレンやポリプロピレン等のポリオレフィン系の各種繊維、ポリビニルアルコール系の各種繊維、ポリ塩化ビニリデン系の各種繊維、ポリ塩化ビニル系繊維、ポリウレタン系の各種繊維、フェノール系繊維、ポリフッ化ビニリデンやポリテトラフルオロエチレン等からなるフッ素系繊維、ポリアルキレンパラオキシベンゾエート系の各種繊維などが挙げられる。また、衣料用以外の繊維、例えば、ポリメチルメタクリレートやポリスチレンなどの透明非晶質高分子を主材料とした光学繊維なども用いることができる。

【0016】

半合成繊維の代表例としては、ジアセテート、トリアセテート、キチン、キトサン等を原料としたセルロース系誘導体系各種繊維、プロミックスと称される蛋白質系の各種繊維などが挙げられる。

再生繊維の代表例としては、ビスコース法や銅-アンモニア法、あるいは有機

溶剤法により得られるセルロース系の各種再生繊維（レーヨン、キュプラ、ポリノジック等）などが挙げられる。

無機繊維の代表例としては、ガラス繊維、炭素繊維などが挙げられる。

天然繊維の代表例としては、綿、亜麻、苧麻、黄麻などの植物繊維、羊毛、絹などの動物繊維、石綿などの鉱物繊維などが挙げられる。

【0017】

本発明に用いる多孔質繊維状材料は、特にその形態が規定されるものではなく、その多孔質繊維断面形状が円形断面でもよく、扁平断面や中空断面などの異形断面でもよい。

本発明に用いる繊維は、無処理の状態でそのまま用いてもよいが、必要に応じて、反応性官能基を導入した繊維であってもよく、また、プラズマ処理や γ 線、電子線などの放射線処理を施した繊維であってもよい。

核酸固定化ゲル保持多孔質繊維を作製する方法は、特に制限されるものではないが、例えば、単量体、多官能性単量体、開始剤及び核酸または末端にビニル基を有する核酸を混合した液に繊維を浸し重合、ゲル化させる方法が挙げられる。また、単量体、多官能性単量体、開始剤及び高分子粒子や無機粒子等の担体に核酸を結合したものを混合した液に繊維を浸し重合、ゲル化させる方法が挙げられる。

【0018】

その他に、単量体、開始剤及び末端にビニル基を有する核酸を共重合したものと架橋剤を混合した液に繊維を浸しゲル化する方法、単量体を開始剤で重合したもの、架橋剤および核酸または高分子粒子や無機粒子等の担体に核酸を結合した粒子を混合した液に繊維を浸しゲル化する方法、核酸を固定化したアガロース等を加熱溶解し、繊維を浸し、冷却ゲル化させる方法等が挙げられる。

【0019】

上述の方法により得られた核酸固定化ゲル保持多孔質繊維は、ゲルが破壊されない限りにおいて適当な処理をすることができる。例えば、熱処理、アルカリ処理、界面活性剤処理などを行うことにより、固定化された核酸を変成させる。あるいは、細胞、菌体などの生材料から得られた核酸を使用する場合は、不要な細

胞成分などを除去する。そして、処理後の核酸固定化ゲル保持多孔質繊維を核酸を検出する材料として用いることができる。なお、これらの処理は別々に実施してもよく、同時に実施してもよい。また、核酸を含む試料をゲルに固定化する前に実施してもよいし、核酸を含む試料をゲルに固定化した後、繊維に保持する前に適宜実施してもよい。

【0020】

上記の通り調製された核酸固定化ゲル保持多孔質繊維は、本発明の核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体を構成する基本単位とすることができる。そして、これらの核酸固定化ゲル保持多孔質繊維を集束した後に接着して、核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体となすことができる。この際、核酸固定化ゲル保持多孔質繊維を規則的に配列し、樹脂接着剤等で接着することにより、例えば、縦横に核酸固定化ゲル保持多孔質繊維が整然と規則的に配列した核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体を得ることができる。核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体の形状は特に限定されるものではないが、通常は、核酸固定化ゲル保持多孔質繊維を規則的に配列させることにより正方形又は長方形に形成される。

【0021】

「規則的に」とは、一定の大きさの枠の中に含まれる核酸固定化ゲル保持多孔質繊維の本数が一定となるように順序よく配列させることをいう。例えば、直径1mmの核酸固定化ゲル保持多孔質繊維を束にして断面が縦10mm、横10mmの正方形となるように配列させようとする場合は、その正方形の枠内(1cm²)における1辺に含まれる核酸固定化ゲル保持多孔質繊維の数を10本とし、この10本の核酸固定化ゲル保持多孔質繊維を1列に束ねて1層のシートとした後、このシートが10層になるように重ねる。その結果、縦に10本、横に10本、合計100本の核酸固定化ゲル保持多孔質繊維を配列させることができる。但し、核酸固定化ゲル保持多孔質繊維を規則的に配列させる手法は、上記のようにシートを重ねるものに限定されるものではない。

【0022】

この場合に、特定の核酸が固定化された核酸固定化ゲル保持多孔質繊維の位置があらかじめ決められた状態で配列することが望ましいが、必ずしもそのように

配列させる必要はない。その理由は、配列体を形成した段階では特定の核酸を固定化した核酸固定化ゲル保持多孔質繊維がどの位置に存在するのかが不明でも、配列体の断面を切断した後、一旦ハイブリダイゼーション手法等を用いて断面における核酸の配置位置を決定することにより、特定の核酸が固定された核酸固定化ゲル保持多孔質繊維の位置を確認することができるためである。従って、この手法を用いて、一度、薄片内に配置された複数種類の核酸の位置を決定しておけば、同一配列体から得られる薄片はすべて同一の位置配置であるので、同一配列体から得られるすべての薄片の核酸の位置配置がわかる。

【0023】

なお、本発明において束にする核酸固定化ゲル保持多孔質繊維の本数は100本以上、好ましくは1,000~10,000,000本であり、目的に応じて適宜設定することができる。但し、配列体における核酸固定化ゲル保持多孔質繊維の密度が、 1 cm^2 当たり100~1,000,000本となるように調製することが好ましい。そして、高密度に核酸が固定化された配列体の薄片を得るべく核酸固定化ゲル保持多孔質繊維を配列させるためには、核酸固定化ゲル保持多孔質繊維の太さは細い方が好ましい。本発明の好ましい実施態様においては、核酸固定化ゲル保持多孔質繊維1本の太さは1mm以下であることが必要である。

【0024】

核酸固定化ゲル保持多孔質繊維が直径 $50\text{ }\mu\text{m}$ のモノフィラメントの場合、 1 cm あたり200本の繊維を配列させることができるため、 1 cm^2 の正方形内に配列させることのできる繊維の本数は40,000本である。したがって、この場合は 1 cm^2 あたり最高40,000種類の核酸を固定化することができる。一方、マルチフィラメントにおいては83dtex/36フィラメントや82dtex/45フィラメント等をそのまま用いることもできる。

ゲルに固定化されている核酸の種類は、配列体中の各繊維ごとにそれぞれ異なるものとすることが可能であり、また、同一の核酸が固定化された繊維から任意の本数の繊維を選択し、その選択された繊維を束ねて適宜配列させることも可能である。即ち、本発明によれば、固定化された核酸の種類と配列の順序に関しては、目的に応じて任意に設定することが可能である。

【0025】

本発明においては、上記の核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体を繊維軸と交差する方向、好ましくは繊維軸に対して垂直方向に切断することにより、核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体断面を有する薄片を得ることができる。この際の切断方法としては、例えば、マイクロトームを用いて配列体から薄片を切り出す方法等が挙げられる。薄片の厚みは任意に調整することができるが、通常1～5,000 μm 、好ましくは10～2,000 μm である。

【0026】

得られた核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体断面を有する薄片には、該配列体を構成する核酸固定化ゲル保持多孔質繊維の数に応じた核酸が存在する。薄片の断面積あたりの核酸の数に関しては、用いる核酸固定化ゲル保持多孔質繊維の外径や配列体作製時の方法等を適宜選択することにより、薄片断面積1 cm^2 あたり100以上、更には1000以上の核酸が固定化された薄片を作製することも可能である。

【0027】

これら薄片は、固定化された核酸をプローブとして、検体と反応させてハイブリダイゼーションを行うことにより、検体中の特定の塩基配列を有する核酸の検出に用いることができる。本発明で言うプローブとは、狭義には検出すべき遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列を有する核酸を指す。即ち、本発明の核酸固定化繊維配列体断面を有する薄片を検体と反応させてハイブリダイゼーションを行い、プローブと相補的な検体中に存在する核酸とのハイブリッドを形成させ、このハイブリッドを検出することにより、目的とする塩基配列を有する検体中の核酸を検出することができる。また、本発明で言うプローブとは、広義には検体中に存在するタンパク質や低分子化合物等と特異的に結合することができる核酸を指す。従って、これらの薄片の利用法としては、固定化された核酸（プローブ）とハイブリッドを形成する核酸を検出するための利用に留まらず、固定化された核酸と特異的に結合するタンパク質や低分子化合物等の各種試料（例えば生体成分等）を検出するための利用が挙げられる。

【0028】

固定化された核酸とハイブリッドを形成する核酸や、固定化された核酸と特異的に結合する各種生体成分の検出には、公知の手段を用いることができる。例えば、検体中の核酸、タンパク質又は低分子化合物等に、蛍光物質、発光物質、ラジオアイソトープなどの標識体を作用させ、この標識体を検出することができる。これら標識体の種類や標識体の導入方法等に関しては、何ら制限されることはなく、従来公知の各種手段を用いることができる。

【0029】

【実施例】

本発明を以下の実施例によって更に詳細に説明する。但し、本発明はこれら実施例によりその技術的範囲が限定されるものではない。

参考例 1

オリゴヌクレオチド及び5'末端にアミノ基またはビオチンを有するオリゴヌクレオチドの調製：

以下に示したオリゴヌクレオチド（プローブA、プローブB）を合成した。

プローブA： GCGATCGAAACCTTGCTGTACGAGCGAGGGCTC（配列番号1）

プローブB： GATGAGGTGGAGGTCAGGGTTTGGGACAGCAG（配列番号2）

【0030】

オリゴヌクレオチドの合成はPEバイオシステムズ社の自動合成機DNA/RNA synthesizer (model394)を用いて行い、DNA合成の最終ステップで、アミノリンクII（商標名）（アプライドバイオシステム社）を用いてそれぞれのオリゴヌクレオチドの5'末端にNH₂(CH₂)₆-を導入しアミノ化したプローブを、およびビオチンアミダイトを用いてビオチン化したプローブを調製した。これらは、一般的手法により脱保護及び精製して使用した。

【0031】

実施例 1 核酸固定化ゲル保持多孔質繊維の作製

参考例1で得られた5'末端にビオチン基を有するオリゴヌクレオチドを含む、以下の組成からなる水溶液を作製した。

アクリルアミド

3.7重量部

メチレンビスアクリルアミド	0.3重量部
2,2'-アゾビス(2-アミジノプロパン)二塩酸塩	0.1重量部
ビオチン化オリゴヌクレオチド(プローブAまたはプローブB)	0.005重量部
アビジン化アガロース(6%)懸濁液	1.0 重量部

【0032】

本溶液にポリエチレン製多孔質繊維(外径200 μ m)を浸した後、内部が水蒸気で飽和された密閉ガラス容器に移し、80℃にて4時間放置することにより重合反応を行った。

その結果、オリゴヌクレオチド(プローブAまたはプローブB)がビオチン-アビジン結合を介して固定化されたゲルを多孔質繊維の空隙部分に保持した繊維が得られた。

【0033】

実施例2 核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体の作製

実施例1で得たプローブAまたはプローブBが固定化されたゲルを保持する多孔質繊維20本を、テフロン板状に互いに重なることなく、且つ密着させて配列し両端を固定した。これに、ポリウレタン樹脂接着剤(日本ポリウレタン工業(株)コロネート4403、ニッポラン4223)を薄く塗布し、ポリウレタン樹脂が十分に固まった後、これをテフロン板上から剥がし、プローブAが固定化された核酸固定化ゲル保持多孔質繊維が一行に配列したシート状物を得た。一方、プローブBが固定化された核酸固定化ゲル保持多孔質繊維についても、同様の操作によりシート状物を得た。次いで、これらのシート状物を図1(3)の配列となるように20枚積層し、上記接着剤を使用して接着し、縦横各々20本ずつ、計400本の繊維が規則的に正方に配列した核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体を得た。

【0034】

実施例3

核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体の薄片の作製:

実施例2で得られた核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体を、繊維軸に直角方向にミクロトームを用いて100 μ mの厚さに切り出すことにより、縦横各々20本、計400本の繊維断面が規則的に正方に配列された核酸固定化ゲル保持多

孔質繊維配列体の薄片を得た(図1(4))。

【0035】

参考例 2

試料核酸の標識：

試料核酸のモデルとして、参考例 1 で合成したオリゴヌクレオチド（プローブ A、プローブ B）の配列の一部に相補的なオリゴヌクレオチド（C、D）を合成した。

オリゴヌクレオチド C：GAGCCCTCGCTCGTACAGCAAGGTTTCG（配列番号 3）

オリゴヌクレオチド D：CTGCTGTCCCAAACCCTGACCTCCACC（配列番号 4）

【0036】

これらのオリゴヌクレオチドの 5' 末端を、参考例 4 と同様にしてアミノリンク II（商標名）（PE バイオシステムズジャパン社）を用いてそれぞれのオリゴヌクレオチドの 5' 末端に $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6-$ を導入した後、以下のようにしてデイゴキシゲニン (DIG: Digoxigenin、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) で標識した。

末端アミノ化されたオリゴヌクレオチドをそれぞれ 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) に終濃度 2 mM になるように溶かした。等量の Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- ϵ -aminocaproic acid-N-hydroxy-succinimide ester (26mg/ml ジメチルホルムアミド溶液) を加え、室温にて一晩静置した。

【0037】

量を 100 μ l に調整し、2 μ l のグリコーゲン（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）、10 μ l の 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)、300 μ l の冷エタノールを加え、15,000rpm 15 分の遠心により沈殿を回収した。沈殿に 500 μ l の 70% エタノールを加え、15,000rpm 5 分の遠心により沈殿を再びチューブの底に集めた。沈殿を風乾し、100 μ l の 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA に溶かした。

こうして得られた DIG 標識オリゴヌクレオチドを試料核酸のモデルとして用いた。

【0038】

参考例 3

ハイブリダイゼーション:

実施例 3 で作製した核酸固定化ゲル保持繊維配列体の薄片をハイブリダイゼーション用のバッグに入れ、以下の組成からなるハイブリダイゼーション溶液を注ぎ込み、45℃で30分間プレハイブリダイゼーションを行った。

参考例 2 で得られた DIG 標識 DNA を加え、45℃で 15 時間ハイブリダイゼーションを行った。

【0039】

ハイブリダイゼーション溶液組成:

5xSSC(0.75M塩化ナトリウム、0.075Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)

5%ブロッキング試薬(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)

0.1% N-ラウロイルザルコシンナトリウム

0.02% SDS(ラウリル硫酸ナトリウム)

50% ホルムアミド

【0040】

参考例 4

検出:

ハイブリダイゼーション終了後、核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体の薄片を、あらかじめ保温しておいた 50 ml の 0.1 x SSC, 0.1% SDS 溶液に移し、振盪しながら20分間の洗浄を45℃で3回行った。

DIG緩衝液 1 を加え、室温で振盪しながらSDSの除去を行った。これを再度繰り返した後、DIG緩衝液 2 を加え 1 時間振盪した。緩衝液を除いた後、DIG緩衝液 2 に10000分の 1 量の抗DIGアルカリフォスファターゼ標識抗体溶液を加えた溶液 10 ml を加え、30分間ゆっくり振盪させることにより抗原抗体反応を行わせた。次に0.2% Tween 20を含むDIG緩衝液 1 で15分間2回振盪することにより洗浄し、引き続き DIG緩衝液 3 に3分間浸した。DIG緩衝液 3 を除いた後、AMPPDを含むDIG緩衝液 3 ml を加え、10分間平衡化した。

【0041】

水分をきり、新しいハイブリダイゼーション用バッグに移し、37℃で1時間おいた後、X線フィルム用のバインダーにX線フィルムとともに挟みフィルムを感光

させた。

その結果、プローブAが配置された場所には、オリゴヌクレオチドCが結合し、プローブBが配置された場所には、オリゴヌクレオチドDが結合していることが確認された。

DIG緩衝液1： 0.1 Mマレイン酸、0.15M塩化ナトリウム(pH7.5)

DIG緩衝液2： DIG緩衝液1に0.5%濃度でブロッキング試薬を添加したもの

DIG緩衝液3： 0.1 Mトリスー塩酸(pH9.5)、0.1 M塩化ナトリウム、
0.05M塩化マグネシウム

ブロッキング試薬： 抗DIGアルカリフォスファターゼ標識抗体溶液および AMPPDはDIG Detectionキット（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）中の試薬である。

【0042】

【発明の効果】

本発明により、核酸固定化ゲル保持多孔質繊維並びに核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体及びその薄片が提供される。

本発明によれば、核酸が任意に高密度且つ正確に配列された核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体の繊維断面を有する薄片を再現性よく効率的に得ることができる。この薄片を用いて、検体中の核酸の種類および量を調べることができる。

【0043】

本発明を従来法と比較した利点、有用性としては、例えば、固定化プロセスを二次元平面上で行わず、一次元構造体としての繊維上で分離・独立して行うことにより、鎖長によらず核酸の定量的固定が可能となったこと、整列化プロセスに各種の繊維賦形技術、ないし織物作製技術の導入による高密度化が可能となったこと、また、その結果得られる選られる三次元構造体としての繊維束から目的とする二次元配列体を作製するため、従来法にはない薄片化プロセスが新たに導入されたが、それに伴いスポッティング法のような誤差の多い微量分注操作が不要となり、連続切片化を通した多量生産が可能となったこと等があげられる。

【 0 0 4 4 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> MITSUBISHI RAYON CO., LTD.

<120> A POROUS FIBER HOLDING NUCLEIC ACID-FIXED GEL, AN ARRAY OF THE FIBERS AND A SLICE OF THE ARRAY

<130> P99-0169

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 1

gcgatcgaaa ccttgctgta cgagcgaggg ctc

33

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 2

gatgaggtgg aggtcagggt ttgggacagc ag

32

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

gagccctcgc tcgtacagca aggtttcg

28

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4

ctgctgtccc aaaccctgac ctccacc

27

【 0 0 4 5 】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 1 : 合成DNA

配列番号 2 : 合成DNA

配列番号 3 : 合成DNA

配列番号 4 : 合成DNA

【図面の簡単な説明】

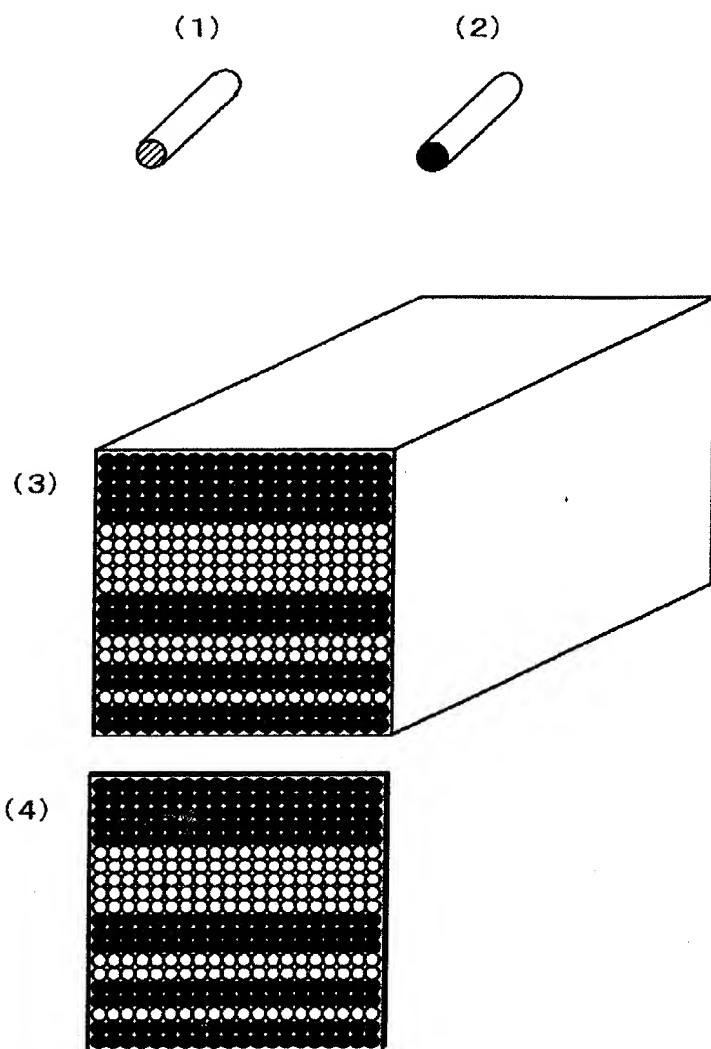
【図 1】

図 1 は核酸固定化ゲル保持多孔質繊維並びに核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体及びその薄片の模式図である。

(1)はプローブ A が固定化された核酸固定化ゲル保持多孔質繊維、(2)はプローブ B が固定化された核酸固定化ゲル保持多孔質繊維、(3)はこれら 2 種の核酸固定化ゲル保持多孔質繊維からなる核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体、及び(4)はこの核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体を繊維軸に対して垂直方向に切断した断面を示す。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 核酸固定化ゲル保持多孔質繊維並びに核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体及びその薄片。

【効果】 核酸が任意に高密度且つ正確に配列された核酸固定化ゲル保持多孔質繊維配列体の繊維断面を有する薄片を再現性よく効率的に得ることができる。この薄片を用いて、検体中の核酸の種類および量を調べることができる。

【選択図】 なし

特平11-083964

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006035]

1. 変更年月日 1998年 4月23日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都港区港南一丁目6番41号
氏 名 三菱レイヨン株式会社

